

二至丸水提物对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用

闫冰^{1,2}, 丁安伟^{1*}, 张丽¹

(1. 南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046;

2. 南京军区南京总医院制剂科, 南京 210002)

[摘要] **目的:** 研究二至丸水提物 (aqueous extract of Erzhi Pill, AEEP) 对四氯化碳 (CCl₄) 所致小鼠急性肝损伤的保护作用。**方法:** 将 60 只昆明种小鼠随机分成 6 组: 正常对照组、四氯化碳损伤模型组、AEEP 高、中、低剂量组 (19.8, 13.2, 6.6 g·kg⁻¹) 和联苯双酯组 (150 mg·kg⁻¹)。AEEP 高、中、低剂量组每日 ig 1 次, 共 7 d, 末次 ig 后除正常组外, 其余所有小鼠予 ip 0.1% CCl₄ 20 mL·kg⁻¹ 1 次, 16 h 后处死全部小鼠, 收集肝组织及血清标本, 测定小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性; 测定肝匀浆中丙二醛 (MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD) 活力; 计算肝指数并同时肝组织进行病理学检查。**结果:** AEEP 具有剂量依赖性地降低 CCl₄ 致小鼠肝损伤血清 ALT, AST 升高, 降低肝匀浆中 MDA 的含量, 增强 SOD 的活性; AEEP 各剂量组能明显改善肝组织的病理变化。**结论:** AEEP 对四氯化碳造成的小鼠急性肝损伤具有显著的保护作用。

[关键词] 二至丸; 四氯化碳; 急性肝损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0131-04

Protective Effect of Aqueous Extract of Erzhi Pill Against Acute Hepatic Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Mice

YAN Bing^{1,2}, DING An-wei^{1*}, ZHANG Li¹

(1. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Dept. of Pharmaceuticals, Nanjing

General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of aqueous extract of Erzhi Pill (AEEP) on acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in mice. **Method:** Sixty Kunming mice were randomly divided into six groups: the normal group, the model group, bifendate group (150 mg·kg⁻¹), high AEEP group (19.8 g·kg⁻¹), middle AEEP group (13.2 g·kg⁻¹) and low AEEP group (6.6 g·kg⁻¹). The treatment groups were orally administered once per day for 7 d separately, whereas the normal and model groups were orally administered with saline. Except normal rats, all the other rats were injected intraperitoneally CCl₄ 20 mL·kg⁻¹ once. The rats were sacrificed 16 h after CCl₄ administration. Serum and liver samples were collected for analysis. The acute hepatic injury model was prepared by CCl₄ injected intraperitoneally. Then, the therapeutic effects of AEEP on the model were evaluated by the activity determination of serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase (ALT and AST), superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in liver, and the hepatic pathohistological changes following the treatment. **Result:** The activities of ALT and AST and the MDA content in liver was significantly increased and the activity of SOD was largely inhibited in the animals of

[收稿日期] 20100702(004)

[基金项目] 江苏省中医药管理局研究项目 (LB09031)

[通讯作者] * 丁安伟, 教授, 博士生导师, Tel: 025-85811523, E-mail: awding105@163.com

modeling group. Following the treatment with AEEP, ALT and AST activities and MDA content were significantly reduced and SOD activity was obviously increased in the mice of treatment group. Furthermore, AEEP could ameliorate the hepatic pathological changes. **Conclusion:** AEEP have protective effects on acute hepatic injury induced by CCl_4 in mice.

[**Key words**] Erzhi Pill; carbon tetrachloride; acute hepatic injury

二至丸出自明代王三才的《医便》^[1],二至丸原名“女贞丹”,由女贞子、墨旱莲二味药组成。女贞子冬至日采,墨旱莲夏至日采,故名曰二至丸,其中女贞子为木樨科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实,墨旱莲草为菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的干燥地上部分。二至丸是平补肝肾的代表方,具有益肝肾、补阴血、壮筋骨、乌须发的功效^[2]。主治肝肾阴虚所致的眩晕耳鸣,失眠多梦,口苦咽干,腰膝酸软,下肢萎软,须发早白,月经量多等症。近年来,鉴于对二至丸的研究多集中在治疗肝肾阴虚等各种病症和免疫系统的药理研究,而对于其保肝降酶的研究较少。笔者采用 CCl_4 致小鼠急性肝损伤模型^[3],研究了 AEEP 对小鼠急性肝损伤的保护作用。

1 材料

1.1 药物和试剂 女贞子(批号 090723)和墨旱莲(批号 090919)购于亳州市永刚饮片厂有限公司,经南京中医药大学张丽副教授鉴定为女贞子 *L. lucidum* Ait. 和墨旱莲 *E. prostrata* L.。

二至丸水提物的制备:将 1 000 g 女贞子与 1 000 g 墨旱莲(1:1)混合后进行常规加工粉碎后过 20 目筛,用水回流提取 3 次,提取液用旋转蒸发器浓缩至相当于含生药 $0.66 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,置冰箱备用。天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(批号 20100215)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(批号 20100212)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20100406)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20100418)及考马斯亮蓝蛋白试剂盒(批号 20100322),以上试剂均购自南京建成生物工程研究所;四氯化碳(CCl_4):分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司,批号 090712,使用时用花生油配制成 0.1% 的花生油溶液;联苯双酯滴丸:北京协和药厂生产,批号 09040208。

1.2 动物 昆明种小鼠,18~22 g,雄性,清洁级,由南京江宁县汤山青龙山动物繁殖场提供,实验动物生产许可证 SCXK(苏)2007-0008。

1.3 仪器 CENTRI-FUGE(AX120)电子天平(日

本产);722S 分光光度仪(上海精密科学仪器有限公司);Anke(LXJ-11B)离心机(上海安寿科学仪器厂);XW-80 型旋涡混合器(上海医大仪器厂);KH2200B 超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组和造模方法 取 60 只小鼠,随机分成 6 组,每组 10 只,分别为正常对照组,四氯化碳损伤模型组,AEEP 高、中、低剂量组($19.8, 13.2, 6.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),联苯双酯组($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。正常对照组及四氯化碳模型组给予同量的生理盐水,给药组连续 ig 7 d。于末次给药后 1 h,除正常组 ip 0.9% NaCl 20 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 外,其余各组均 ip 0.1% CCl_4 花生油溶液 20 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。染毒 16 h 后,所有小鼠采用眼眶放血法采血,分离血清,测定血清中 ALT 及 AST 的活性。取血后每只小鼠立即剖腹,取 1 小块肝组织,用 10% 的福尔马林溶液固定,进行石蜡包埋切片。同时另取相同部位的 1 小块肝组织用生理盐水制备成 10% 的肝匀浆,硫代巴比妥酸法测定每克肝组织中 MDA 含量,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力。

2.2 生化指标检测 赖氏法测定血清 ALT,AST 活性,硫代巴比妥酸法测定肝匀浆中 MDA 含量,考马斯亮蓝蛋白法测定肝匀浆中蛋白质含量,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力,按公式计算肝指数:

$$\text{肝脏指数} = \frac{\text{肝质量}(\text{g})}{\text{体重}(\text{g})} \times 100\%$$

2.3 病理学检查 用 10% 福尔马林溶液固定肝组织,常规石蜡包埋切片(片厚 5 μm),HE 染色,光镜下观察肝组织病理学变化。将肝组织损伤程度分为 4 级:0 级(-),肝组织结构正常,无明显变性、坏死及炎症细胞浸润;I 级(+),肝小叶结构尚正常,可见明显的混浊肿胀、气球样变或脂肪变性,散在点状坏死;II 级(++),肝小叶结构不清,可见明显的灶状坏死伴有炎症细胞浸润;III 级(+++),肝小叶结构不清、可见明显的片状坏死伴有炎症细胞浸润。

2.4 统计学分析 各项数据采取 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,所有资料的统计分析均用 SPSS 16.0 软件包完成。对肝脏组织病理学变化经 Ridit

分析统计处理, $P < 0.05$ 为显著性界限。

3 结果

3.1 对急性肝损伤小鼠血清生化指标的影响 由表 1 可见,模型组血清中 ALT,AST 的含量明显高于正常对照组 ($P < 0.01$),说明本次实验的小鼠急性肝损伤造模成功。AEEP 能剂量依赖性降低小鼠血清 ALT,AST 水平,其效果与阳性对照药联苯双酯效果相似。其中,AEEP 高、中剂量组与联苯双酯组血清 ALT,AST 值与模型组比较差异具有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 AEEP 对急性肝损伤小鼠血清 AST 和 ALT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) U·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT	AST
正常对照	-	37.71 ± 12.93 ²⁾	77.12 ± 19.40 ²⁾
模型	-	212.26 ± 29.38	237.51 ± 14.20
联苯双酯	0.15	140.34 ± 28.06 ²⁾	181.67 ± 12.88 ²⁾
二至丸	19.8	138.43 ± 24.53 ²⁾	182.98 ± 11.32 ²⁾
	13.2	152.65 ± 26.78 ²⁾	209.31 ± 13.11 ¹⁾
	6.6	171.32 ± 29.49	216.39 ± 9.97

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对急性肝损伤小鼠肝匀浆 MDA 含量、SOD 活性和肝脏指数的影响 由表 2 可见,CCl₄ 肝损伤模型组小鼠肝脏 MDA 活性显著升高 ($P < 0.01$),SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$),说明本次实验的小鼠急性肝损伤造模成功。而 AEEP 对这些变化都有不同程度的抑制作用。其中,AEEP 高、中剂量组与联苯双酯组肝匀浆中 MDA 含量及 SOD 活性与模型组比较差异具有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

模型组小鼠的肝脏指数显著高于空白组 ($P < 0.01$),说明模型组肝脏增大。AEEP 高、中剂量组能显著降低由 CCl₄ 升高的肝脏指数 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明 AEEP 可能对小鼠肝脏轻度肿胀有一定的缓解作用。

表 2 AEEP 对急性肝损伤小鼠肝匀浆 MDA,SOD 和肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MDA /μmol·g ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	肝脏指数 /%
正常对照	-	8.91 ± 1.24 ²⁾	25.59 ± 2.53 ²⁾	4.52 ± 0.32 ²⁾
模型	-	26.85 ± 8.52	9.62 ± 3.22	5.65 ± 0.26
联苯双酯	0.15	14.52 ± 2.85 ²⁾	20.55 ± 3.45 ²⁾	4.66 ± 1.45 ²⁾
二至丸	19.8	13.46 ± 2.43 ²⁾	20.14 ± 5.82 ²⁾	4.73 ± 1.13 ²⁾
	13.2	16.23 ± 5.31 ²⁾	16.71 ± 4.46 ¹⁾	4.89 ± 0.74 ¹⁾
	6.6	21.80 ± 6.28	12.16 ± 4.27	5.12 ± 1.18

3.3 对急性肝损伤小鼠肝组织病理学的影响 病理切片结果表明,正常对照组小鼠肝组织结构正常,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞索、肝血窦排列规则,肝小叶结构完整,未见肝细胞变性、坏死等病理变化。CCl₄ 模型组小鼠肝组织结构镜下可见大多数肝细胞浑浊肿胀,细胞质疏松化,有的呈气球样变,以环中央静脉分布的肝细胞灶性或片状坏死,伴炎性细胞浸润等病理改变。AEEP 各剂量组的肝细胞坏死,变性及炎性细胞浸润程度均有减轻,经 Ridit 法统计处理,均有统计学意义,表明 AEEP 各剂量组均有保护肝损伤作用,结果见图 1,表 3。

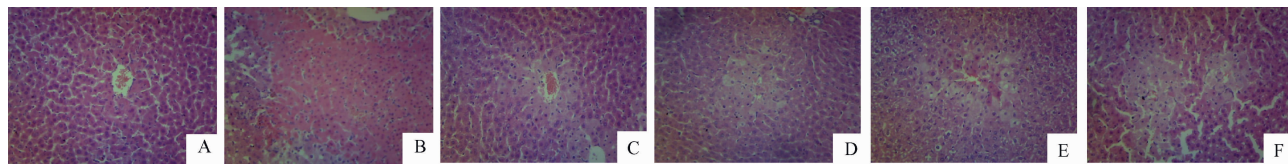


图 1 各组小鼠肝组织染色 (HE × 100)

A. 正常组; B. 模型组; C. 联苯双酯 0.15 g·kg⁻¹组; D. AEEP 19.8 g·kg⁻¹组; E. AEEP 13.2 g·kg⁻¹组; F. AEEP 6.6 g·kg⁻¹组

表 3 AEEP 对急性肝损伤小鼠肝组织病理学损伤的影响 (n = 10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肝细胞变性				肝细胞坏死				炎性细胞浸润			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常对照	-	9	1	0	0 ²⁾	10	0	0	0	9	1	0	0 ²⁾
模型	-	0	0	2	8	0	0	2	8	0	0	3	7
联苯双酯	0.15	4	5	1	0 ²⁾	5	4	1	0 ²⁾	3	6	1	0 ²⁾
二至丸	19.8	3	6	1	0 ²⁾	4	4	2	0 ²⁾	3	5	2	0 ²⁾
	13.2	2	5	3	0 ²⁾	3	4	3	0 ²⁾	2	6	2	0 ²⁾
	6.6	2	4	3	1 ¹⁾	2	3	4	1	2	3	5	0 ¹⁾

4 讨论

肝病是一种发病率高,难以根治的疾病,对人类健康危害极大,而且不良的饮食习惯、药物、毒物等均能导致肝脏疾病,损害肝细胞。大量研究表明,在肝细胞病变过程中,自由基、酶及脂质过氧化等均发挥重要作用^[4]。CCl₄所致急性肝损伤模型是最常用的经典模型之一^[5],其机制为:CCl₄在肝内经微粒体细胞色素 P450 分解活化,生成活泼的三氯甲基自由基和氯自由基,导致肝微粒体的脂质过氧化。由于脂质过氧化反应增强而抗氧化能力下降,导致自由基增加,通过过氧化细胞膜脂质,使肝细胞结构和功能受到损害。文献报道酚羟基是抗脂质过氧化作用的主要功能基团^[6]。二至丸由女贞子、墨旱莲二味药组成,2 个单方中都含有丰富的黄酮物质^[7-8],此类物质富含酚羟基,具有较强的抗氧化能力,因而推测其具有保肝护肝的作用。本实验结果表明,给小鼠使用 AEEP 高、中剂量组后,小鼠血清中 AST、ALT 较模型组活性均明显降低,说明 AEEP 高、中剂量组能够显著减轻 CCl₄所致的急性肝损伤可能与其含有丰富的酚羟基有关。

近期研究报道:SOD 是氧自由基的清除剂,肝细胞受到自由基攻击时,SOD 可因其过度消耗而减少,体内 SOD 活性越高,自由基清除的速度越快。MDA 是脂质过氧化的最终产物,其含量反映了组织过氧化的损伤程度^[9]。本实验研究结果表明,AEEP 高、中剂量组可以明显升高肝损伤模型小鼠肝组织 SOD 活性,同时降低其 MDA 的含量,推测 AEEP 中所含的酚羟基能够直接阻断或终止自由基连锁反应链,从而阻止氧自由基反应和脂质过氧化反应,最终抑

制脂质过氧化产物 MDA 的生成。

综上所述,AEEP 具有对抗急性肝损伤的作用,其机制可能与 AEEP 中酚羟基所具有的抗脂质过氧化作用有关,这为我们进一步研究二至丸的保肝降酶作用提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] 彭怀仁. 二至丸、人参胡桃汤、龟鹿二仙胶考源[J]. 湖北中医杂志,1984(5):32.
- [2] 窦志英,宋坤,丁安伟. 二至丸对四氯化碳所致小鼠 ALT 升高的预防作用[J]. 天津中医学院学报,2002, 21(3):45.
- [3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:75.
- [4] 郑荣梁. 自由基生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 1992:142.
- [5] Chang M L, Yeh C T, Chang P Y, et al. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation[J]. World J Gastroenterol,2005,11 (27):4167.
- [6] Fukumoto L R, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds[J]. J Agric Food Chem,2000,48(8):3597.
- [7] 徐小花,杨念云,钱士辉,等. 女贞子黄酮类化合物的研究[J]. 中药材,2007,30(5):538.
- [8] 袁继承,蒋永和,沈志滨. 旱莲草化学成份的研究进展[J]. 亚太传统医药,2009,5(1):125.
- [9] 张秀明,陈科力,李翰明,等. 蛇葡萄根的保肝降酶及抗自由基损伤作用[J]. 中国药师,1999, 2(5):225.

[责任编辑 聂淑琴]